



Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias

Edição 2010/2011

Relatório de Projecto

**Análise do Perfil de Libertação da Levofloxacinina a partir de
Micropartículas de Fosfato de Cálcio**

Bolseiro: Luís Carvalho

**Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Curso: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
Ano: 3º Ano**

Tutora: Prof.^a Doutora – Ana Bettencourt

Índice

Resumo	4
Abstract	5
Lista de abreviaturas	6
1. Introdução	7
2. Objectivos do Trabalho	7
3. Materiais	8
4. Métodos Analíticos	9
4.1. Curva de Calibração	9
4.2. Validação do Método Analítico	10
4.3. Avaliação da Estabilidade da Solução de Levofloxacina	10
4.4. Ensaaios de Capacidade de Carga	11
4.5. Ensaaios de Libertação	11
4.6. Determinação da Levofloxacina Remanescente Após Ensaaios de Libertação	12
4.7. Ensaaios de Microbiologia	12
5. Resultados e Discussão	13
5.1. Validação do Método Analítico	13
5.2. Avaliação da Estabilidade da Solução de Levofloxacina	15
5.3. Ensaaios de Capacidade de Carga	15
5.4. Ensaaios de Libertação	16
5.5. Determinação da Levofloxacina Remanescente Após Ensaaios de Libertação	20
5.6. Ensaaios de Microbiologia	20
6. Conclusões	21
7. Execução Financeira de acordo com o Plano Orçamental Previsto	22
8. Referências Bibliográficas	23
9. Agradecimentos	24

Resumo

A Osteomielite é uma patologia do osso caracterizada por inflamação e normalmente causada por infecção. Devido à má vascularização do osso, é difícil obter concentrações terapêuticas de antibiótico por via de administração sistémica. A libertação *in situ* de antibióticos é uma estratégia que permite libertação do antibiótico directamente na zona afectada, permitindo obter concentrações terapêuticas nesse local e limitando efeitos adversos sistémicos. Há dois tipos principais de sistemas de libertação local: biodegradáveis e não biodegradáveis. Cimentos ósseos compostos por micropartículas de fosfato de cálcio são materiais biodegradáveis que permitem o preenchimento de fendas no osso afectado após cirurgia, sem necessitar de cirurgia posterior para remoção do material. Este tipo de estratégia permite obter concentrações terapêuticas de antibiótico localmente por períodos prolongados de tempo.

Neste projecto estudámos a libertação de levofloxacina a partir de vários tipos de grânulos compostos por micropartículas de fosfato de cálcio. As amostras foram avaliadas por espectrofotometria de UV. Todos os tipos de grânulos estudados libertam o antibiótico rapidamente, permitindo a obtenção de concentrações elevadas de fármaco, mas limitando o seu uso em terapêutica prolongada. Os perfis de libertação foram ajustados a modelos de cinética de libertação de fármacos, nomeadamente, ordem zero, exponencial, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas. Os grânulos de fosfato de cálcio dopados com estrôncio e magnésio parecem ser mais estáveis em termos de massa de levofloxacina incorporada, sendo também os mais eficientes na libertação do antibiótico. As amostras obtidas dos ensaios de libertação foram testadas em estirpes de referência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mantendo a actividade antimicrobiana.

Concluimos que embora este tipo de veículo de libertação de fármacos pareça apresentar vantagens no tratamento de patologias como a osteomielite, são necessários mais estudos de forma a obter uma libertação mais gradual do antibiótico e um aumento da estabilidade do mesmo nos grânulos.

Abstract

Osteomyelitis is a bone pathology characterized by inflammation and usually caused by infection. Due to the bone reduced vascularization, it is difficult to achieve therapeutic concentrations of antibiotic with systemic administration. Local antibiotic delivery is an alternative strategy which will allow release of the antibiotic directly to the affected bone, allowing therapeutic concentrations of antibiotic to be achieved locally, and restricting side effects. There are two major types of local delivery systems: biodegradable and non biodegradable. Calcium phosphate bone cements are biodegradable materials, which allow filling of the gap in the affected bone after surgery, without the need for removal surgery. This type of approach allows high concentrations of antibiotic to be released locally for long periods of time.

In this project we have studied levofloxacin release from several types of granules, composed of calcium phosphate microparticles. The samples were evaluated by UV spectrophotometry. All granule types show a fast release of antibiotic, allowing high concentrations to be achieved, but restricting its use in prolonged therapies. The release profiles were fitted to different release kinetic models, namely the zero order, exponential, Hixson Crowell and Korsmeyer-Peppas. Calcium phosphate granules, with residues of strontium and magnesium seem to be more stable in terms of levofloxacin mass. This type of granules was the most efficient in releasing the antibiotic. The samples obtained from the release studies were tested in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* reference strands, showing antimicrobial activity. We concluded that even though this type of drug delivery system seems to have advantages in the treatment of pathologies like osteomyelitis, further development is necessary in order to get a more controlled release and increased stability of the antibiotic in the bone cements.

Lista de Abreviaturas

Grânulos CaPO_4 – Grânulos de fosfato de cálcio

Grânulos Sr – Grânulos de fosfato de cálcio com resíduos de estrôncio

Grânulos SrMg – Grânulos do fosfato de cálcio com resíduos de estrôncio e magnésio

L.D. – Limite de detecção

LEVO – Levofloxacina

L.Q. – Limite de quantificação

MIC – Concentração mínima inibitória

PBS – Phosphate buffer saline

SD – Desvio padrão

UV – Ultravioleta

1. Introdução

A Osteomielite é uma patologia caracterizada por inflamação óssea, normalmente causada por infecções, em que *Staphylococcus aureus* é o agente mais comum¹. Pode provocar destruição inflamatória, necrose e neoformação do osso². O tratamento é difícil, exigindo frequentemente intervenção cirúrgica¹. A antibioterapia tem uma duração recomendada de 4 a 6 semanas, sendo também descrita com a duração de 6 meses³. O osso é um tecido moderadamente vascularizado, o que limita a quantidade de antibiótico que pode chegar à área afectada durante a terapêutica com antibióticos⁴. Assim, existe interesse em desenvolver novas terapias, como sistemas de libertação local de antibióticos, de modo a obter quantidades elevadas de fármaco no local de acção⁵. Esta abordagem permite também manter uma baixa concentração sistémica, reduzindo efeitos adversos⁶. Existem veículos biodegradáveis e veículos não biodegradáveis. Os sistemas biodegradáveis, como cimentos de fosfato de cálcio incorporados com antibióticos, permitem libertar grandes quantidades de fármaco por períodos prolongados de tempo, sendo também possível colmatar cavidades criadas por remoção cirúrgica do osso, sem necessidade de cirurgia posterior para remoção do implante⁷.

Korkusuz et al.⁸ e Shinto et al.⁹ estudaram sistemas de libertação da gentamicina em veículos de fosfato de cálcio com modelos animais, conseguindo libertações de cerca de 90 dias, com ponto máximo de libertação por volta do oitavo dia de libertação.

Cimentos ósseos compostos por micropartículas de fosfato de cálcio são biodegradáveis e têm ganho aceitação clínica como substitutos do osso, devido à sua semelhança com a composição mineral do osso¹⁰. O uso de fluoroquinolonas como a levofloxacina (LEVO) no tratamento da osteomielite é actualmente uma abordagem terapêutica bem implementada¹¹.

Neste trabalho estudámos *in vitro* a libertação de LEVO a partir de cimentos ósseos constituídos por micropartículas de fosfato de cálcio.

2. Objectivos do Trabalho

O principal objectivo deste trabalho é contribuir para a caracterização dos perfis de libertação da LEVO a partir de cimentos ósseos compostos por micropartículas de fosfato de cálcio. As micropartículas foram estudadas em forma de grânulos (fig. 1-A), existindo 3 tipos: fosfato de cálcio (CaPO_4), fosfato de cálcio com resíduos de estrôncio (Sr) e fosfato de cálcio com resíduos de estrôncio e magnésio (SrMg). Pretendeu-se comparar



Fig. 1 - A. Grânulos de CaPO_4 ; B. Cilindros.

os perfis de libertação de antibiótico a partir dos diferentes tipos de grânulos. Foi também estudada uma quarta forma de micropartículas de fosfato de cálcio, em agregado cilíndrico (fig. 1-B). Foram realizadas duas séries independentes de ensaios de libertação, tendo a primeira sido realizada em Outubro de 2010 e a segunda em Março de 2011. O trabalho compreendeu ainda a validação do método analítico de quantificação da LEVO por Espectrofotometria de UV e a avaliação da actividade microbiológica da LEVO libertada nos ensaios de libertação, utilizando estirpes bacterianas de referência.

3. Materiais

Amostras para Análise

- Grânulos de Fosfato de Cálcio com LEVO;
- Grânulos de Fosfato de Cálcio e Estrôncio com LEVO;
- Grânulos de Fosfato de Cálcio, Estrôncio e Magnésio com LEVO;
- Grânulos controlo sem LEVO;

As amostras foram preparadas na Universidade de Aveiro, Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro.

Reagentes

Os reagentes utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes utilizados.

Material	Referência	Composição	Características	Precauções	Notas
Água Destilada	-	-	Líquido incolor, inodoro, límpido	-	-
Álcool 96°	Merck	-	-	Inflamável	-
LEVO	SIGMA 28266-106-F BioChemika	-	Pó de cor branca	Nocivo	Decompõe-se quando exposto à luz
Ácido Clorídrico	Merck	-	-	Corrosivo	-
PBS (Phosphate buffer saline)	SIGMA P-3813 PHOSPHATE BUFFERED SALINE pH 7.4	NaCl 0.138M, KCl 0.0027M	pH 7,4 a 25 C°	-	Dissolver o conteúdo de 1 saqueta em 1L de água
Azida Sódica	Merck	-	-	Potencialmente cancerígeno	Utilizado como antifúngico
Meio de Cultura Muellen-Hinton agar	Biokar BK048HA	-	-	-	Meio de crescimento para ensaios microbiológicos

Estirpes Bacterianas utilizadas nos Ensaios de Microbiologia

- *Escherichia coli* ATCC25922;
- *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Equipamento de Laboratório

- Balanças Analíticas “METTLER AE 200” e “Precisa 180A”;
- Espectrofotómetro “HITACHI U-2000 Spectrophotometer”;
- Banhos “Julabo SW 21” e “Julabo F 10”;
- Aparelho de Ultrassons P. Selecta;
- Centrífuga “Brofuge pico Heraeus”;

Material diverso de Laboratório

- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| - Copos de precipitação; | - Micropipeta; |
| - Balões volumétricos; | - Pontas para pipeta automática; |
| - Funis de vidro; | - Pompets; |
| - Espátulas metálicas; | - Tubos de plástico; |
| - Cuvetes de quartzo; | - Papel de filtro; |
| - Pipetas volumétricas; | - Tubos Eppendorf® 1mL e 1,5mL; |
| - Pipetas graduadas; | - Microplacas de 96 poços GREINER; |

4. Métodos Analíticos

4.1. Curva de Calibração

Foi preparada uma solução-mãe (1) de LEVO em mistura água:etanol 97:3. Para preparar a solução-mãe pesou-se aproximadamente 10mg de LEVO, registando-se a massa efectivamente pesada e dissolveu-se em 25mL de mistura água:etanol 97:3 (V/V). Foi calculada a concentração da solução a partir da massa de LEVO. A partir da solução-mãe (1) preparou-se 100mL de uma solução padrão (2) de LEVO de concentração igual a 10µg/mL. A partir da solução padrão (2) foram preparadas várias soluções (3) de concentração bem definida: 0,5µg/mL, 1µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL, 6µg/mL, 8µg/mL, 10µg/mL, dissolvendo o volume necessário da solução padrão (2) em água destilada de modo a perfazer 25mL. Foram preparadas três soluções padrão adicionais (3), de concentração igual a 12µg/mL, 14µg/mL e 16µg/mL, diluindo o volume necessário da solução-mãe (1) em água. Utilizando a solução padrão (2) de concentração igual a 10µg/mL foi efectuado um espectro de varrimento na zona do UV de modo a determinar o comprimento de onda de máxima absorvência da LEVO. Foram efectuadas leituras de absorvência no comprimento de onda de máxima absorvência da LEVO das várias soluções padrão (3) preparadas. Para cada solução foram efectuadas três leituras não sequenciais. Os valores de absorvência obtidos foram corrigidos utilizando uma solução de água destilada. A curva de calibração foi

obtida por regressão linear dos valores de absorvência obtidos em relação à respectiva concentração da solução medida (3). Foi determinada a equação da curva e o coeficiente de correlação linear. A curva de calibração utilizada durante o trabalho foi $y = 0,1037x + 0,0256$.

4.2. Validação do Método Analítico

O método analítico utilizado foi a espectrofotometria de UV. Na validação do método analítico foram avaliados os parâmetros: linearidade, repetibilidade, precisão inter-dias, selectividade e limites de detecção e quantificação.

Para avaliar a linearidade foram realizadas três curvas de calibração conforme descrito no ponto 4.1. Os coeficientes de correlação foram avaliados de modo a determinar a existência de linearidade entre a resposta do espectrofotómetro em relação à concentração das várias soluções padrão.

A repetibilidade do método foi avaliada através da preparação de soluções de três concentrações diferentes iguais a 0,5µg/mL, 10µg/mL e 14µg/mL. Para cada valor de concentração foram preparadas 10 soluções. Foram realizadas leituras de absorvência das 10 soluções e calculado o desvio padrão das absorvências lidas.

Para avaliar a precisão inter-dias foram realizadas leituras de absorvência de soluções de três concentrações iguais a 0,5µg/mL, 10µg/mL e 14µg/mL, em três dias diferentes. Para cada solução foram realizadas três leituras não sequenciais. Foi calculado o desvio padrão das absorvências lidas.

A selectividade do método foi estudada realizando dois espectros de varrimento UV/visível (200-400nm) de duas soluções de LEVO de concentrações iguais a 0,5 e 10µg/mL. Deverá ser observado um maior pico de absorção da LEVO no espectro correspondente à solução de maior concentração.

Para determinação dos limites de detecção (L.D.) e quantificação (L.Q.) foram utilizados os resultados das leituras de absorvência para estudo da precisão. Os limites foram calculados através das equações 1 e 2.

$$L.D. = 3 \times SD \text{ (eq. 1)}$$

$$L.Q. = 10 \times SD \text{ (eq. 2)}$$

Equações 1 e 2 – Fórmulas para cálculo dos limites de detecção (1) e quantificação (2), onde SD representa o desvio padrão de 10 leituras de absorvência de soluções de baixa concentração do analito (0,5µg/ml).

4.3. Avaliação da Estabilidade da Solução de Levofloxacina

De modo a estudar a estabilidade da LEVO em solução foi preparada uma solução-mãe de LEVO como descrito em 4.1. Esta solução foi distribuída por oito recipientes. Metade dos recipientes foi armazenada a 4°C e os restantes a -20°C. Aos 7, 21, 35 e

49 dias foi recuperado um frasco de cada temperatura. A partir de cada frasco foram preparadas três soluções de concentração bem definida: 0,5µg/mL, 10µg/mL e 14µg/mL. Foram efectuadas três leituras de absorvência não sequenciais para cada uma das soluções no comprimento de onda de máxima absorvência da LEVO. Foi avaliada a variação da concentração das soluções de LEVO em função do tempo. Foi comparada a estabilidade das soluções armazenadas a diferentes temperaturas.

4.4. Ensaios de Capacidade de Carga

Para cada tipo de grânulo foram pesadas duas unidades, correspondendo aproximadamente a 12mg, sendo registada a massa efectivamente pesada. Os dois grânulos foram colocados em balão volumétrico de 10mL. Aferiu-se os balões com ácido clorídrico 0,25N. Para ajudar a dissolução dos grânulos os balões foram colocados em banho de ultrassons durante aproximadamente 5min. Foram retirados 500µL de cada solução para um novo balão volumétrico de 10mL. Cada um dos balões foi aferido com água destilada. Foram realizadas as leituras de absorvência de cada solução no comprimento de onda de máxima absorvência da LEVO. Para cada solução foram efectuadas três leituras não sequenciais. Foi calculada a concentração de cada solução e determinada a massa inicial de LEVO nos grânulos, utilizando a equação referida em 4.1.

4.5. Ensaios de Libertação (ensaio descrito para um tubo em ensaio de libertação):

Foram pesados dois grânulos, registando a massa efectivamente pesada. Estes foram colocados em tubo de plástico de 15mL (fig. 2-A). Foi adicionado ao tubo 10mL de PBS. Retirou-se uma alíquota de 2,5mL ao tubo, sendo a amostra armazenada para análise posterior, correspondendo esta amostra ao ensaio de $t=0h$. O volume inicial foi repostado adicionando 2,5mL de PBS ao tubo de plástico. O tubo foi colocado em banho com agitação a 37°C (fig. 2-B) e ao abrigo



Fig. 2 – A. Grânulos em tubo de plástico durante ensaio de libertação. B. Tubos de ensaio de libertação em agitação a 37°C.

da luz. Em vários intervalos de tempo definidos os tubos foram agitados brevemente por inversão e foram retiradas alíquotas de 2,5mL do tubo, sendo o volume inicial de 10mL repostado de cada vez por adição de 2,5mL de PBS. Os intervalos de tempo em que foram retiradas amostras foram: 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, 48h, 168h e 336h. Foram realizadas três leituras de absorvência não sequenciais de cada alíquota retirada ao tubo no comprimento de onda de máxima absorvência da LEVO. Os valores de absorvência obtidos foram tratados em folha de cálculo (*Microsoft Excel 2007*) de

modo a obter os perfis de libertação do fármaco para o tipo de grânulo em estudo. Os resultados dos ensaios de libertação foram ajustados a modelos matemáticos comumente utilizados na descrição da libertação de fármacos¹². Foram avaliados os modelos de ordem zero, exponencial, Hixson-Crowel e Korsmeyer-Peppas.

4.6. Determinação da Levofloxacina Remanescente Após Ensaios de Libertação

Foram obtidos os grânulos dos tubos dos ensaios de libertação e colocados em balões volumétricos de 10mL. Os balões foram aferidos com água destilada e levados ao banho de ultrassons até dissolução completa dos grânulos. Foram realizadas três leituras de absorvência não sequenciais de cada solução no comprimento de onda de máxima absorvência da LEVO. Foi determinada a concentração das soluções e a quantidade de LEVO presente nos grânulos após os ensaios de libertação.

4.7. Ensaios de Microbiologia:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A (Controlo Positivo)	A								
B (0,078 µg/mL)	B								
C (0,156 µg/mL)	C								
D (0,312 µg/mL)	D								
E (0,625 µg/mL)	E								
F (1,250 µg/mL)	F								
G (2,500 µg/mL)	G								
H (5,000 µg/mL)	H								

Fig. 3 - Microplaca utilizada nos ensaios de microbiologia.

Legenda: Gr. – Grânulos.

CaPO ₄ , 7d	Sr, 7d	SrMg, 7d	CaPO ₄ , 7d	Sr, 7d	SrMg, 7d	Controlo	Padrão	Meio
------------------------	--------	----------	------------------------	--------	----------	----------	--------	------

Os ensaios de microbiologia foram realizados em microplacas de 96 poços (fig. 3). Em cada poço foram colocados 100µL de meio Muellen Hinton. Foram depois colocados 100µL de cada solução e 10µL de suspensão bacteriana, conforme descrito de seguida. A linha A corresponde a um controlo positivo, contendo apenas 10µL de suspensão bacteriana e 100µL de meio. Na coluna 8 foram preparadas

soluções padrão de LEVO. Depois de colocar os 100µL de meio nos poços foram colocados 100µL de solução padrão de LEVO (10µg/mL) no poço H8, resultando numa concentração de 5µg/mL nesse poço. De H8 foram retirados 100µL, sendo estes colocados no poço directamente acima. Este processo foi repetido, realizando sucessivas diluições de factor 2 e obtendo concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078µg/mL, do poço H8 até B8, sendo que, no poço B8 foram retirados 100µL para que todos os poços tenham o mesmo volume. Em todos estes poços foram colocados 10µL de suspensão bacteriana. Nos poços correspondentes às linhas B a H e às colunas 1 a 7 foram colocadas várias amostras provenientes dos ensaios de libertação. Estas foram colocadas nos poços para que a concentração final de antibiótico no poço seja a mesma em todas as linhas, tendo como referência a coluna

8. As amostras colocadas correspondem ao tempo de libertação de 7 dias, sendo as colunas 1 e 4 correspondentes a grânulos de fosfato de cálcio, as colunas 2 e 5 grânulos de fosfato de cálcio com resíduos de estrôncio, as colunas 3 e 6 grânulos de fosfato de cálcio com resíduos de estrôncio e magnésio e a coluna 7 grânulos controlo sem LEVO. Um resultado positivo será provocado por crescimento bacteriano, que se manifesta por surgimento de turvação nos poços. A coluna 9 corresponde a um controlo negativo, contendo apenas meio de cultura.

5. Resultados e Discussão

5.1. Validação do Método Analítico

- Linearidade:

O intervalo de linearidade de um método indica o intervalo de concentrações para o qual os resultados são directamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito nas amostras¹³. A linearidade do método foi avaliada através da construção de 3 curvas de calibração (fig. 4). As concentrações das soluções variaram entre 0,5 e 16 µg/mL. Para as três experiências verificou-se a existência de linearidade na resposta do espectrofotómetro em relação às concentrações crescentes das soluções ($r^2 > 0,995$).

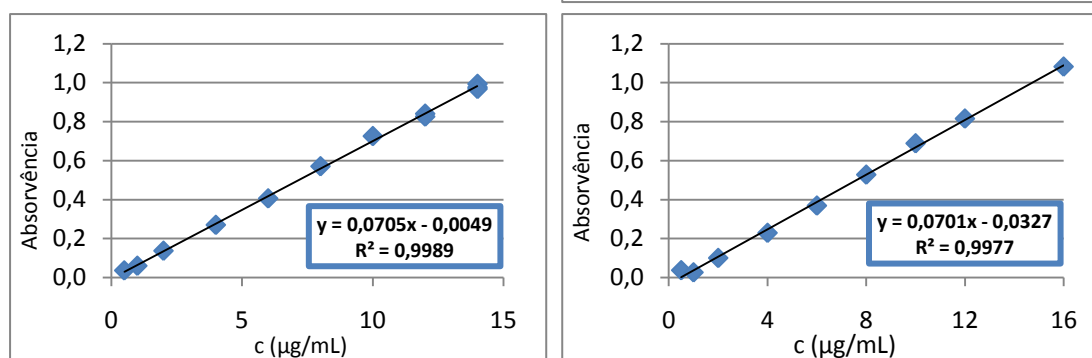


Fig. 4 - Curvas de Calibração para estudo da linearidade do método.

- Repetibilidade e Precisão Inter-dias:

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre os resultados de testes individuais cujo procedimento é aplicado repetidamente a amostras múltiplas de uma amostra homogénea. A repetibilidade exprime a precisão de um método analítico efectuado em condições idênticas¹³. Para estudar a

repetibilidade foram utilizadas 10 soluções de cada uma de três concentrações bem definidas iguais a 0,5; 10 e 14 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados das leituras de absorvência das 10 soluções e o respectivo desvio padrão encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Estudo da Repetibilidade.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvências										DP
0,5	0,035	0,036	0,038	0,042	0,035	0,034	0,032	0,032	0,034	0,037	0,003
10	0,363	0,359	0,364	0,453	0,363	0,361	0,363	0,363	0,362	0,364	0,029
14	1,040	1,044	1,040	1,272	1,048	1,019	1,018	1,022	1,008	1,050	0,077

A precisão inter-dias exprime a precisão do método analítico sobre experiências efectuadas em dias diferentes¹³. Para estudo da precisão inter-dias utilizaram-se soluções de concentrações iguais a 0,5; 10 e 14 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados das leituras de absorvência em três dias diferentes encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Estudo da Precisão Inter-dia.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Média de Absorvências			DP
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
0,5	0,029	0,029	0,026	0,002
10	0,645	0,671	0,694	0,024
14	0,935	1,007	0,964	0,036

Globalmente, os valores obtidos não indicam uma variação estatisticamente significativa pelo que se conclui que o método apresenta repetibilidade e precisão inter-dias adequadas para ser utilizado para a quantificação da LEVO.

- Selectividade:

A selectividade define-se como a capacidade de um método para identificar e distinguir um analito, sem interferência dos outros componentes da amostra¹³. Os espectros de varrimento UV/visível (200-400nm) de duas soluções de LEVO de concentrações iguais a 0,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ encontram-se na fig. 4. Verificou-se que ao aumentar a concentração da solução de LEVO ocorreu aumento do pico de absorção no comprimento de onda de máxima absorvência ($\lambda = 293\text{nm}$) da LEVO. Conclui-se que o método analítico é selectivo para o analito em estudo.

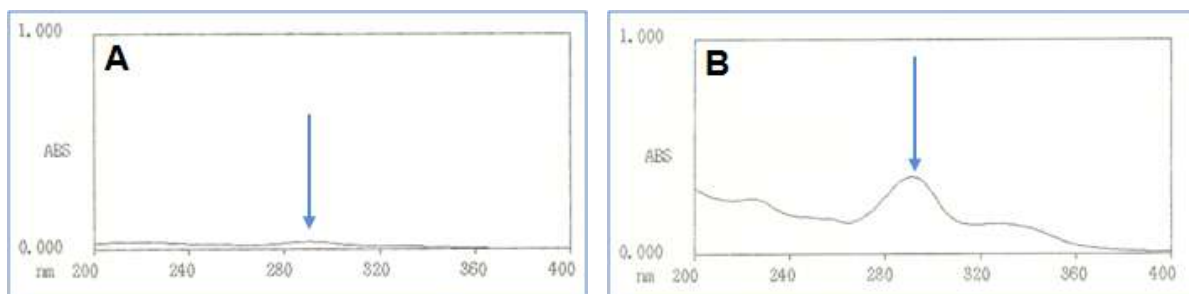


Fig. 4 - Estudo da selectividade do método. Espectros de varrimento de soluções de LEVO com concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (B).

- Limites de Detecção e Quantificação:

O L.D. é definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar, mas não necessariamente quantificar, a presença do analito com uma certeza estatística razoável nas condições experimentais de trabalho. O L.Q. corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada precisão e exactidão¹³.

L.D. e L.Q. foram calculados através das equações 1 e 2. O L.D. do método é igual a 0,009 μ g/mL. O L.Q. do método é igual a 0,03 μ g/mL.

5.2. Avaliação da Estabilidade da Solução de Levofloxacin

A estabilidade da LEVO em PBS foi estudada em soluções de concentrações iguais a 0,5; 10 e 14 μ g/mL. Estas foram armazenadas a 4°C e -20°C. Os resultados dos ensaios encontram-se ilustrados na fig. 5. Verificou-se que não existe variação significativa da massa de LEVO na solução em qualquer das três concentrações, pelo que se conclui que a LEVO é estável em solução de PBS a 4°C e -20°C até t=49dias. Relativamente à avaliação da estabilidade da solução a 0,5 μ g/mL só é possível avaliar a estabilidade até t=35dias. O valor obtido t=49dias corresponde na nossa opinião a um erro experimental.

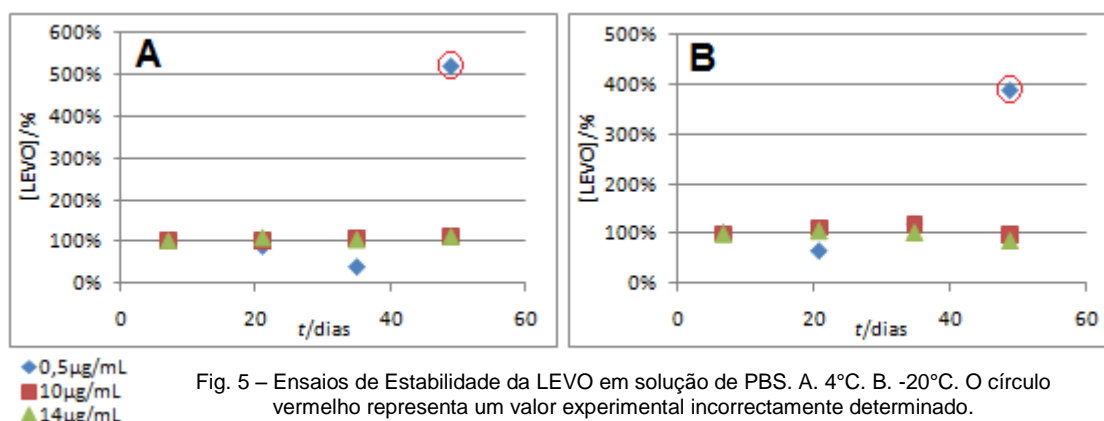


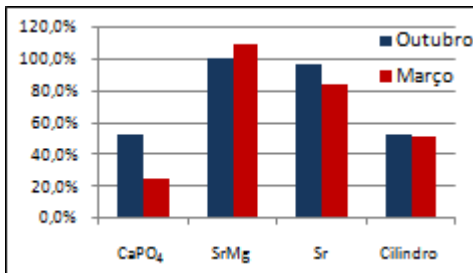
Fig. 5 – Ensaio de Estabilidade da LEVO em solução de PBS. A. 4°C. B. -20°C. O círculo vermelho representa um valor experimental incorrectamente determinado.

5.3. Ensaio de Capacidade de Carga

A quantidade teórica de LEVO existente nos grânulos é 5 μ g/mL. Os ensaios de capacidade de carga são utilizados para determinar a quantidade real de LEVO existente nos grânulos. Foram realizados dois ensaios independentes, com um intervalo de 5 meses, correspondendo aos momentos de realização dos ensaios de libertação, de modo a evidenciar a possível ocorrência de degradação da LEVO nos grânulos. Os resultados foram obtidos em folha de cálculo *Microsoft Excel* 2007 e apresentam-se na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados dos Ensaios de Capacidade de Carga.

	Outubro 2010		Março 2011	
	Massa Levo/10mg de grânulos (µg)	% em relação ao valor teórico	Massa Levo/10mg de grânulos (µg)	% em relação ao valor teórico
CaPO ₄	260,7	52,1%	123,7	24,7%
SrMg	503,8	100,8%	548,1	109,6%
Sr	482,5	96,5%	418,7	83,7%
Cilindro	260,6	52,1%	256,2	51,2%



Verificou-se que no início da experiência os grânulos SrMg e Sr apresentavam uma massa de LEVO semelhante à massa teórica. Os grânulos CaPO₄ e os Cilindros apresentavam cerca de metade da massa de LEVO teórica. Após 5 meses verifica-se que para os grânulos SrMg e os Cilindros a quantidade de LEVO não variou significativamente. Para os grânulos Sr verificou-se uma diminuição de cerca de 13% em relação ao valor teórico. Os grânulos de CaPO₄ apresentam uma diminuição de cerca de 27% em relação ao valor teórico.

Concluimos que os grânulos que apresentam valor mais próximo do teórico em massa de LEVO são os grânulos SrMg e Sr. Destes, os grânulos SrMg apresentam menor variação de massa de LEVO com o tempo. Os grânulos CaPO₄ e o Cilindro são os piores quando comparamos a massa real com a massa teórica. Destes, os grânulos CaPO₄ são os que apresentam maior variação em relação à massa real de LEVO.

Os resultados obtidos nestes ensaios foram utilizados como valores correspondentes à massa inicial de LEVO nos grânulos para os ensaios de libertação.

5.4. Ensaios de Libertação

Estes ensaios permitem estudar os perfis de libertação da LEVO a partir dos três tipos de grânulos de fosfato de cálcio. Foram realizados dois ensaios independentes, com 5 meses de intervalo (n=3).

Os perfis de libertação da LEVO a partir dos 3 tipos de grânulos no primeiro ensaio, realizado em Outubro de 2010, encontram-se ilustrados na fig. 6.

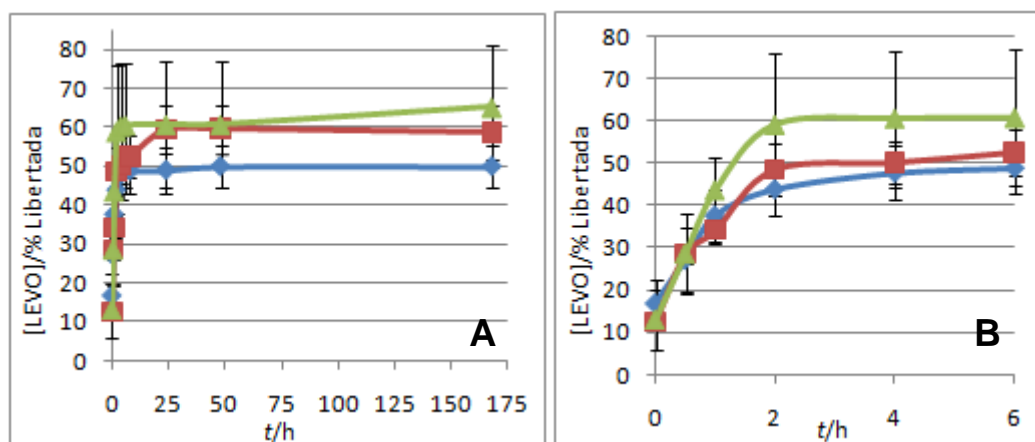


Fig. 6 - Perfis de libertação da LEVO a partir dos três tipos de grânulos. A. Libertação entre t_0 e t_{168} . B. Libertação entre t_0 e t_6 . Valores correspondentes ao primeiro ensaio (Outubro 2010).

Verifica-se que para todos os tipos de grânulos há uma libertação de LEVO superior a 50% até $t=6h$. Os grânulos SrMg apresentaram a libertação mais rápida e completa ($65\% \pm 16\%$). Os grânulos Sr libertaram $60\% \pm 7\%$ e os grânulos de fosfato de cálcio libertaram $50\% \pm 6\%$ do seu conteúdo em LEVO. Os grânulos SrMg são, no entanto, aqueles que apresentam maior dispersão de resultados entre experiências independentes.

O ensaio de libertação foi repetido para todos os grânulos 5 meses após o primeiro ensaio ($n=3$). Os resultados desta experiência encontram-se na fig. 7.

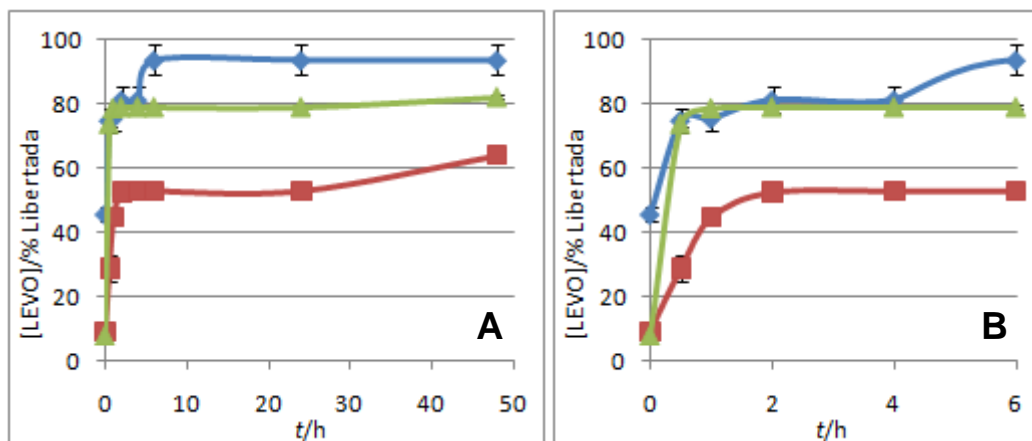


Fig. 7 - Perfis de libertação da LEVO a partir dos três tipos de grânulos; A. Libertação entre t_0 e t_{168} ; B. Libertação entre t_0 e t_6 . Valores correspondentes ao segundo ensaio (Março 2011).

Verificou-se que os grânulos CaPO₄ libertaram $94\% \pm 9\%$ da sua massa inicial de LEVO. Os grânulos SrMg libertaram $82\% \pm 2\%$ e os grânulos Sr libertaram $64\% \pm 1\%$. Estes resultados sugerem que os grânulos CaPO₄ apresentam a libertação mais completa, no entanto verificou-se que houve degradação da forma dos grânulos em solução, o que pode ter contribuído para a libertação de grande parte da massa de LEVO. Isto compromete a possibilidade de uso destes grânulos in vivo como cimentos ósseos¹⁴.

Averiguou-se se a quantidade de LEVO libertada pelos grânulos é suficiente para atingir concentrações terapêuticas contra a estirpe ATCC25923 de *S. aureus*, com MIC₅₀ de 8 µg/mL e MIC₉₀ de 16 µg/mL¹⁵. A análise dos dados encontra-se na fig. 8.

A MIC₅₀ e a MIC₉₀ são as mínimas concentrações de fármaco necessárias para eliminar o crescimento visível de, respectivamente, 50% e 90% da população do microorganismo alvo¹⁶. Verificou-se que para os três tipos de grânulos a concentração de LEVO corresponde à MIC₅₀ nos tempos t_0 e $t_{0,5}$. Em relação aos grânulos Sr a concentração de LEVO corresponde à MIC₉₀ entre t_0 e $t_{0,5}$. Para os grânulos SrMg a concentração de LEVO corresponde à MIC₉₀ entre $t_{0,5}$ a t_1 e para os grânulos CaPO₄ entre t_{24} e t_{48} . Assim, conclui-se que as concentrações obtidas pela libertação de

LEVO são superiores às MIC_{50} e MIC_{90} , sendo possível obter concentrações terapêuticas *in vitro*. Os resultados sugerem que os grânulos Sr são os que permitem atingir a MIC_{90} mais rapidamente. Neste trabalho, a actividade microbiológica das amostras obtidas nos ensaios de libertação foi testada em estirpes de referência de *S. aureus* e *E. coli*.

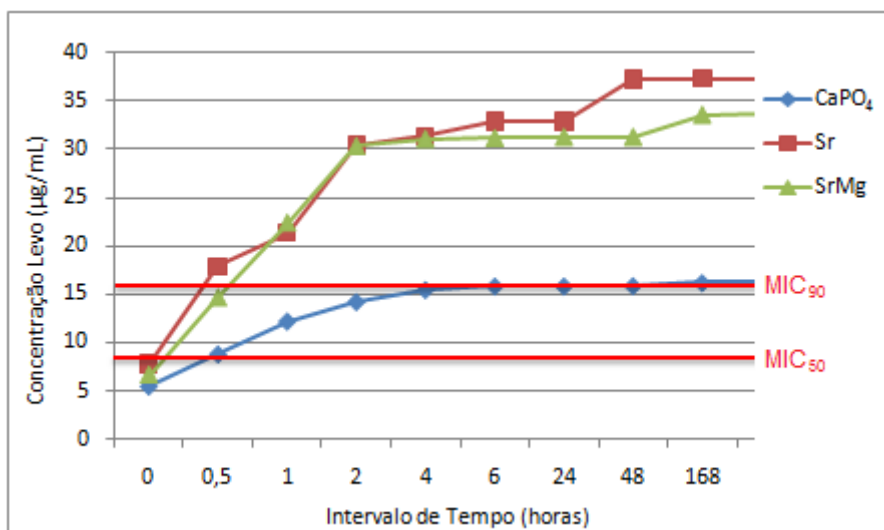


Fig. 8 - Relação entre a concentração atingida no tubo de ensaio de libertação e a MIC de uma estirpe de referência de *S. aureus*.

Foi igualmente avaliada a libertação de LEVO a partir de micropartículas de fosfato de cálcio agregadas em cilindros ($n=3$). Os resultados do ensaio de libertação com os cilindros encontram-se na fig. 9. Não foi estudado o perfil de libertação após 5 meses, uma vez que a forma cilíndrica se desagregou completamente ao adicionar o PBS para realizar o ensaio de libertação (fig. 10).

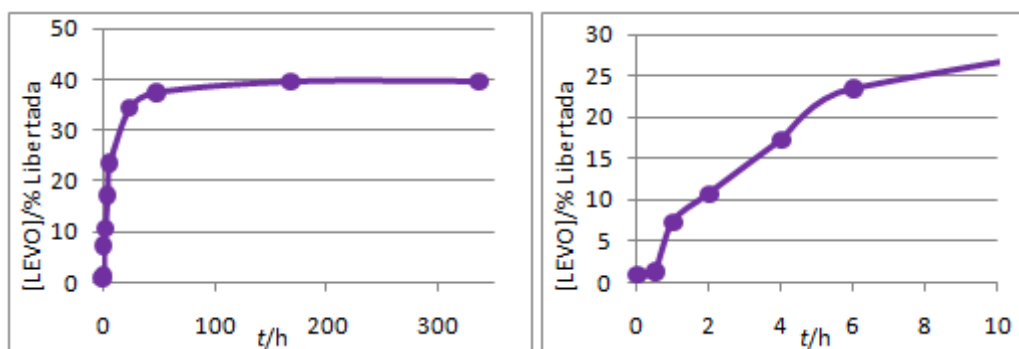


Fig. 9 – Perfil de Libertação da LEVO a partir dos cilindros. A. Libertação entre t_0 e t_{336} ; B. Libertação entre t_0 e t_{10} .

Verificou-se que o cilindro liberta cerca de $40\% \pm 1\%$ da massa inicial de LEVO. Em t_6 o cilindro libertou apenas $23\% \pm 1\%$ da massa de LEVO inicial, o que indica que poderá ser vantajoso para conseguir uma libertação prolongada, uma vez que nos grânulos a libertação estabiliza após t_6 . No entanto a forma cilíndrica parece ser mecanicamente menos estável, o que poderá limitar o seu uso clínico.

Para interpretação dos perfis de libertação da LEVO a partir dos grânulos de fosfato de cálcio, os resultados experimentais obtidos nos ensaios de libertação foram ajustados a modelos matemáticos usados para descrever a libertação de fármacos a partir de formas farmacêuticas¹⁷:



Fig. 10 - Cilindros intactos (A) e cilindro desagregado após adição de PBS (B).

a) Ordem Zero¹⁸

(equação 3)

$$C = k_0 t$$

C - concentração de fármaco no tempo t .
 k_0 - const. vel. de ordem zero.
 t - tempo.

b) Exponencial¹⁹

(equação 4)

$$C = a(1 - e^{-k_E t})$$

C - concentração de fármaco no tempo t .
 a - concentração máxima de fármaco.
 k_E - const. vel. de primeira ordem.
 t - tempo.

c) Hixson-Crowell²⁰

(equação 5)

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} t$$

Q_0 - massa inicial de fármaco no sistema.
 Q_t - massa de fármaco libertada no tempo t .
 K_{HC} - const. vel. de Hixson-Crowell.
 t - tempo.

d) Korsmeyer-Peppas²¹

(equação 6)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$$

M_t/M_∞ - fracção de fármaco libertada no tempo t .
 K - const. vel.
 n - parâmetro que caracteriza o tipo de libertação.
 t - tempo.

Legenda: const.vel. – constante de velocidade

Tabela 4 - Ajuste dos Perfis de Libertação a modelos matemáticos.

Modelo	Coeficientes de Correlação			
	CaPO ₄	Sr	SrMg	Cilindro
Ordem Zero	0,1392	0,1885	0,2654	0,4338
Exponencial	0,7444	0,8524	0,8705	0,9770
Hixson-Crowell (Até 2h)	0,9148	0,9661	0,9510	0,9153
Korsmeyer-Peppas	NA	NA	NA	NA

* Não aplicável porque $n < 0,5$, não apresentando significado físico.

Os coeficientes de correlação obtidos no ajuste aos vários modelos encontram-se descritos na tabela 4.

O modelo de Hixson-Crowell ajusta-se até $t=2h$ como exemplificado na fig. 11.

O modelo exponencial é o que melhor descreve a cinética de libertação até $t=14$ dias, como exemplificado na fig. 12.

Os parâmetros necessários à caracterização dos perfis de libertação pelos modelos exponencial e de Hixson-Crowell encontram-se ilustrados nas tabelas 5 e 6.

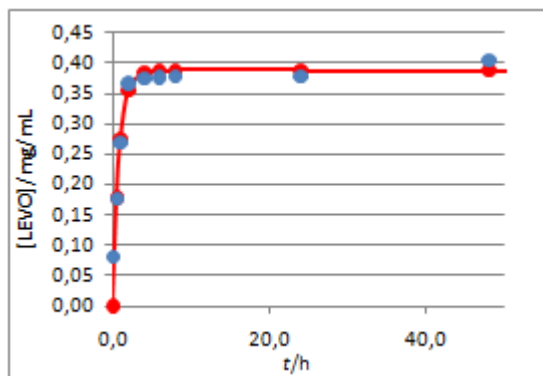


Fig. 11 - Exemplo da aplicação do modelo exponencial a valores experimentais de dissolução da LEVO, a partir de grânulos de SrMg (t=50h): •, resultados experimentais; —, ajuste exponencial.

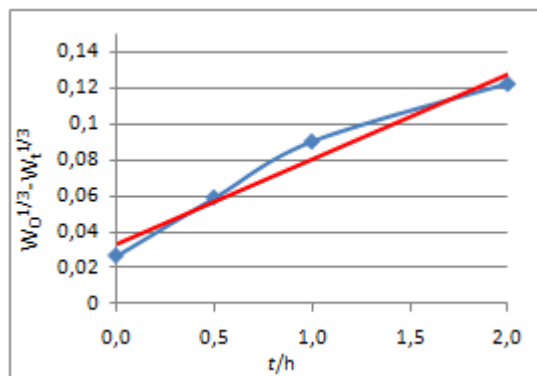


Fig. 12 - Exemplo da aplicação do modelo de Hixson-Crowell a valores experimentais de dissolução da LEVO, a partir de grânulos de SrMg, durante as duas primeiras horas: •, resultados experimentais; —, ajuste linear.

Tabela 5 – Ajuste dos Perfis de Liberação ao modelo exponencial.

	Modelo Exponencial			
	CaPO ₄	Sr	SrMg	Cilindro
a/%	0,1270	0,0344	0,3884	7,8590
k _e /h ⁻¹	1,5096	1,1380	1,2272	0,1709

Tabela 6 – Ajuste dos Perfis de Liberação ao modelo de Hixson-Crowell (Até 2h).

	Modelo Hixson-Crowell (Até 2h)			
	CaPO ₄	Sr	SrMg	Cilindro
k _{HC} /μg ^{-1/3}	0,1270	0,0344	0,3884	7,8590

5.5. Determinação da Levofloxacina Remanescente Após Ensaio de Liberação

O objectivo deste ensaio é determinar a concentração remanescente de LEVO nos grânulos utilizados nos ensaios de liberação. A quantidade de LEVO remanescente em todos os tipos de grânulos foi inferior ao L.D. do método analítico, indicando que toda a LEVO foi libertada.

5.6. Ensaio de Microbiologia

Foram realizados ensaios de microbiologia para avaliar se a LEVO libertada a partir dos grânulos de fosfato de cálcio mantém a actividade antimicrobiana contra estirpes de *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados dos ensaios encontram-se na fig. 13.

	<i>S. aureus</i>									<i>E. coli</i>								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A (Controlo Positivo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B (0,078 μg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
C (0,156 μg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
D (0,312 μg/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
E (0,625 μg/mL)																		
F (1,250 μg/mL)																		
G (2,500 μg/mL)																		
H (5,000 μg/mL)																		

Fig. 13 - Resultados dos Ensaio de Microbiologia; o sinal + indica que ocorreu crescimento bacteriano com consequente turvação do meio.

Para *S. aureus*, ocorreu crescimento nas linhas 1 a 6 para concentrações inferiores a 0,625µg/mL. Conclui-se que a MIC para *S. aureus* será inferior a 0,625µg/mL. Para *E. coli* apenas ocorreu crescimento nas linhas 1 a 6 para o controlo positivo. Assim conclui-se que a MIC para *E. coli* será inferior a 0,078µg/mL. Para ambas as amostras os controlos apresentaram resultados com significado equivalente. No controlo positivo (linha A, excepto A9) ocorreu sempre turvação. No controlo negativo (coluna 9) nunca ocorreu turvação. Na coluna 7, correspondente aos grânulos controlo ocorreu sempre turvação. Na coluna 8, correspondente ao padrão de LEVO, ocorreu turvação nas mesmas concentrações que para as amostras.

Concluimos que as amostras obtidas a partir dos ensaios de libertação apresentam actividade antimicrobiana contra as estirpes de referência estudadas. Os resultados sugerem ainda que a actividade microbiológica do antibiótico não é influenciada pela sua incorporação nos grânulos de fosfato de cálcio.

6. Conclusões

Os resultados experimentais obtidos no decurso deste trabalho permitem concluir que:

- a espectrofotometria de UV é um método adequado à quantificação da LEVO em solução (apresenta linearidade para a gama de concentrações entre 0,5 e 16µg/mL, repetibilidade, precisão inter-dias, selectividade, L.D. igual a 0,009µg/mL e L.Q. igual a 0,03µg/mL).
- a solução de LEVO em PBS é estável no tempo, até 49 dias, quando armazenada a temperaturas de 4°C e -20°C.
- em termos de capacidade de carga os grânulos SrMg e Sr apresentam cerca de 100% da massa teórica de LEVO, enquanto os grânulos CaPO₄ e o Cilindro apresentam 52% da massa teórica. Após 5 meses, os grânulos CaPO₄ e Sr apresentam 25% e 84% da massa teórica de LEVO, respectivamente. Os grânulos SrMg e os cilindros mantêm a massa determinada anteriormente. Conclui-se que os grânulos SrMg apresentam a maior eficiência de incorporação de LEVO e a maior estabilidade da LEVO incorporada.
- nos ensaios de libertação todos os grânulos libertam uma massa de LEVO superior a 50% nas primeiras 6 horas. Os grânulos SrMg apresentam a libertação mais rápida e completa, apresentando no entanto a maior dispersão de resultados entre experiências, com 65% ± 16% de massa de LEVO libertada no primeiro ensaio e 82% ± 2% no segundo ensaio. Os grânulos CaPO₄ libertaram 50% ± 6% da massa inicial de LEVO no primeiro ensaio e 94% ± 9% no segundo ensaio, embora se tenha verificado degradação da forma dos grânulos que pode explicar o valor elevado obtido no segundo ensaio e comprometer o uso destes grânulos in vivo. Os grânulos Sr

libertaram $60\% \pm 7\%$ da massa inicial de LEVO no primeiro ensaio e $64\% \pm 1\%$ no segundo ensaio.

- as concentrações de LEVO atingidas nos ensaios de libertação ultrapassam a MIC_{50} entre t_0 e $t_{0,5}$ para todos os grânulos. A MIC_{90} é atingida entre t_0 e $t_{0,5}$ para os grânulos Sr, entre $t_{0,5}$ e t_1 para os grânulos SrMg e entre t_{24} e t_{48} para os grânulos $CaPO_4$. Conclui-se que as concentrações de LEVO obtidas *in vitro* apresentarão actividade terapêutica.

- os cilindros libertaram $40\% \pm 1\%$ da massa de LEVO. Embora apresentem uma libertação mais gradual, são mecanicamente menos estáveis que os grânulos, o que impediu o estudo do perfil de libertação de LEVO passados 5 meses e poderá também limitar o seu uso clínico.

- Para todos os grânulos avaliados os resultados dos ensaios de libertação ajustam-se ao modelo de Hixson-Crowell para as primeiras duas horas de libertação e ao modelo exponencial quando consideramos o perfil completo.

- A LEVO libertada a partir dos grânulos mantém a actividade antibacteriana contra estirpes de *E. coli* e *S. aureus* de referência, não sendo afectada pelo processo de incorporação nas micropartículas de fosfato de cálcio.

Concluimos que os grânulos testados são eficientes na libertação de LEVO. Este tipo de veículos de libertação local de antibióticos poderá ser uma alternativa à antibioterapia oral na terapêutica de patologias como a osteomielite. No entanto, a rápida libertação do antibiótico poderá comprometer o seu uso em terapêuticas prolongadas, pelo que será necessário realizar mais investigação nesta área.

7. Execução Financeira de acordo com o Plano Orçamental Previsto

O resumo da execução financeira encontra-se descrito na tabela 7.

Tabela 7 – Resumo da execução financeira do projecto.

	Reagentes	Coluna HPLC*	Antibiótico	Material de Vidro	Total
Despesas Previstas	€ 300	€ 300	€ 180	€ 200	€ 980
Despesas Efectivas	€ 250	-	€ 180	€ 200	€ 630

*Não foi adquirida coluna de HPLC, uma vez que o método analítico utilizado foi a espectrofotometria de UV.

Os custos inerentes à realização deste projecto foram suportados pelo financiamento plurianual da FCT.

8. Referências Bibliográficas

1. Chihara, S. and Segreti, J. *Osteomyelitis*. Dis Mon 56:6-31 0011-5029 (2010).
2. Jorge *et al.* *Osteomyelitis: a current challenge*. Braz J. Infect. Dis. 14(3): 310-315 (2010).
3. Lazzarini *et al.* *Antibiotic treatment of osteomyelitis: what have we learned from 30 years of clinical trials?*. International Journal of Infectious Diseases. 9, 127-138, 1201-9712 (2005).
4. Dash A. K., and Suryanarayanan, R.. *An implantable dosage form for the treatment of bone infections*. Pharm. Res. 9:993-1002 (1992).
5. El-kamel, A. and Baddour, M. *Gatifloxacin Biodegradable Implant for Treatment of Experimental Osteomyelitis: In Vitro and In Vivo Evaluation*. Drug Delivery, 14: 1-8 (2007).
6. Gitelis, S. and Brebach, G. *The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant*. J. Orthop. Surg. 10:53-60 (2002).
7. Nandi, S.K. *et al.* *Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review*. Materials Science and Engineering C 29 2478-2485 (2009).
8. Korkusuz *et al.* *Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites*. Bone Joint Surg. 75-B 111 (1993).
9. Shinto *et al.* *Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics*. J Bone and Joint Surg. 74 600 (1992).
10. Pina *et al.* *Influence of setting liquid composition and liquid-to-powder ratio on properties of a Mg-substituted calcium phosphate cement*. Acta Biomater 10.1016 (2008).
11. Castro *et al.* *Ciprofloxacin implants for bone infection. In vitro-in vivo characterization*. J. Control. Rel. 93:341-354 (2003).
12. Shoaib *et al.* *Evaluation Of Drug Release Kinetics From Ibuprofen Matrix Tablets Using HPMG*. Pak. J. Pharm. Sci., Vol.19(2), 119-124 (2006).
13. ICH Q2B: *Validation of Analytical Procedures: Methodology* (1997).
14. LeGeros, R. and LeGeros J. *Calcium Phosphate Bioceramics: Past, Present and Future*. Key Engineering Materials Vols. 240-242 pp 3-10 (2003).
15. Presterl *et al.* *Ciprofloxacin-and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Susceptible to Moxifloxacin, Levofloxacin, Teicoplanin, Vancomycin and Linezolid*. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases 20 486-489 (2001).
16. Andrews, J. *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48, Suppl. S1, 5-16 (2001).
17. Costa, P. and Lobo, J. *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 13 123-133 (2001).
18. Hadjiioannou *et al.* *Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research*. VCH Publishers Inc., New York, pp.345-348 (1993).
19. Bourne, D. *Pharmacokinetics*. Modern Pharmaceutics, 4th ed., Marcel Dekker Inc. pp.67-92 (2002).
20. Hixson A. and Crowell J. *Dependence of reaction velocity upon surface and agitation (I) theoretical consideration*. Ind. Eng. Chem., 23: 923-931 (1931).
21. Korsmeyer *et al.* *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers*. Int. J. Pharm., 15: 25-35 (1983).

9. Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Bettencourt,
pelo apoio, disponibilidade, dedicação, conhecimento, revisão, amizade e por ter
possibilitado a realização deste projecto.

À Professora Doutora Aida Duarte,
pela realização dos ensaios de microbiologia no seu laboratório.

À Cláudia Sofia Jorge Vilhena,
pela amizade e ajuda nos ensaios de microbiologia.

À Universidade de Lisboa e à Fundação Amadeu Dias,
pela criação desta iniciativa e pela atribuição das bolsas que permitem a execução dos
projectos e a integração dos alunos no mundo da investigação.